

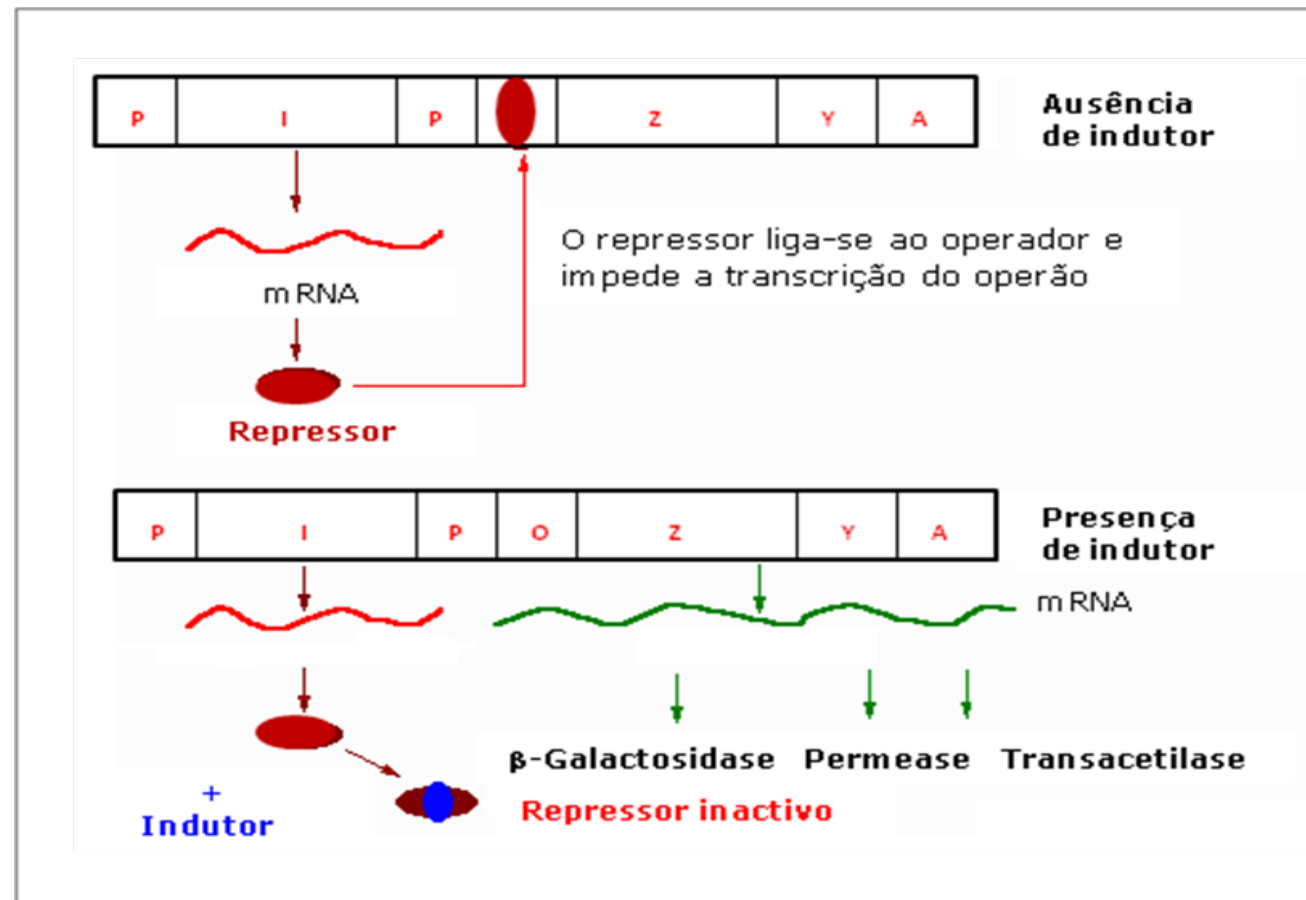
ENGENHARIA GENÉTICA

Uma experiência de clonagem molecular – Fundamento e Protocolos

Clonagem num vector de fusão traducional para detecção dos sinais de transcrição e de tradução de um gene em *Escherichia coli*

Exemplo de um **sistema vector/hospedeiro** baseado nas propriedades do operão *lac*

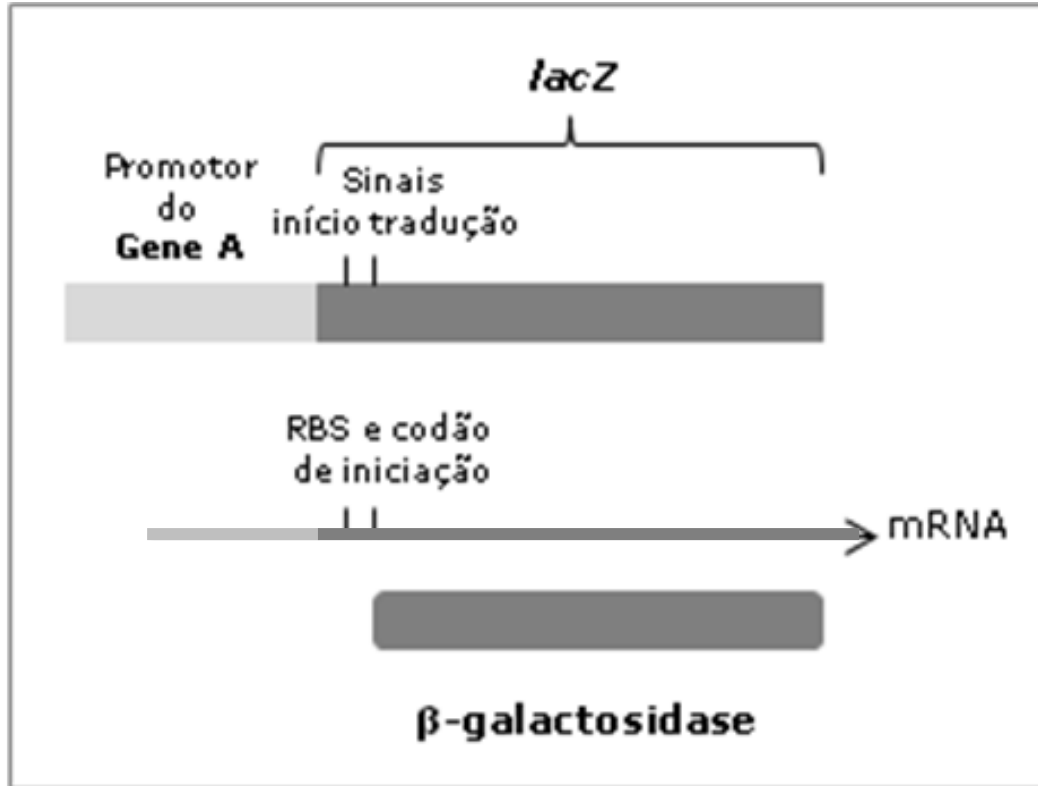
Características estruturais, regulação e utilidade do operão *lac*



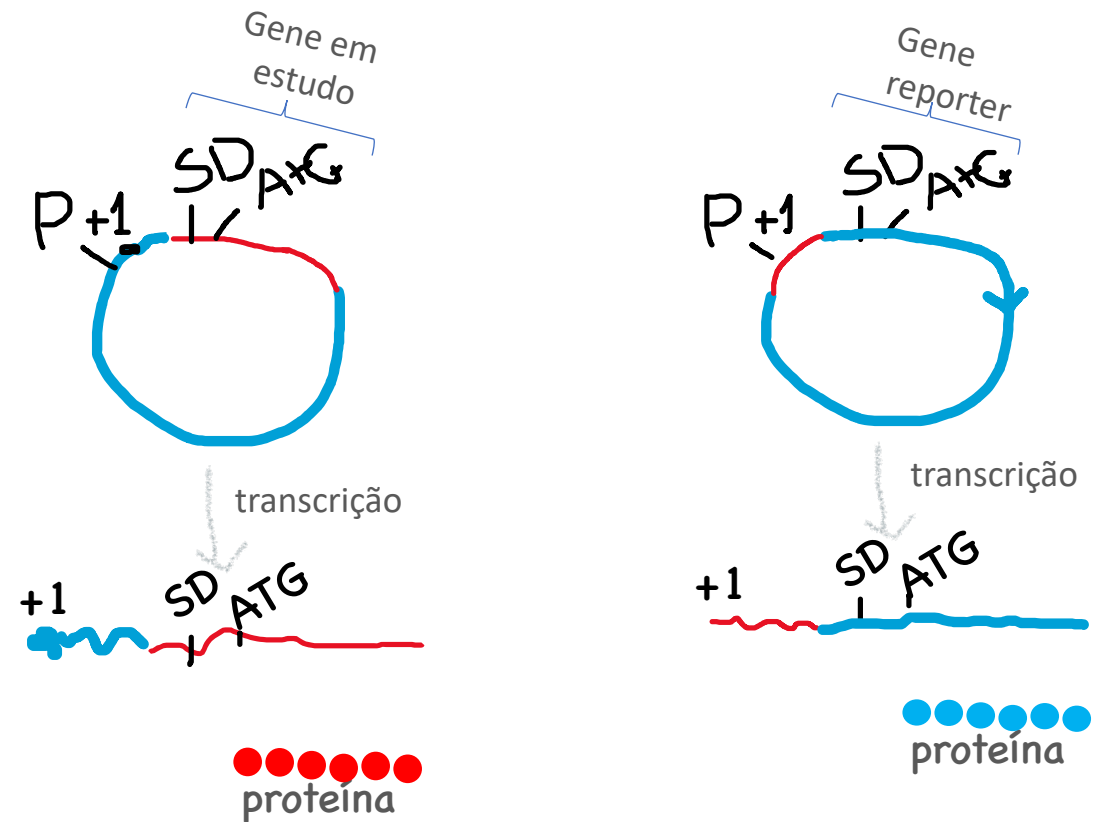
Nos sistemas experimentais:

- o **indutor** utilizado na indução da transcrição do operão *lac* é o **IPTG** (isopropil-β-D-tiogalactósido), um composto que não é metabolizado (análogo da alolactose)
- a **deteção da síntese de β-galactosidade** é feita através do **X-gal** (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido), um composto incolor que liberta uma cor azul quando clivado pela β-galactosidade

Fusões génicas transcricionais

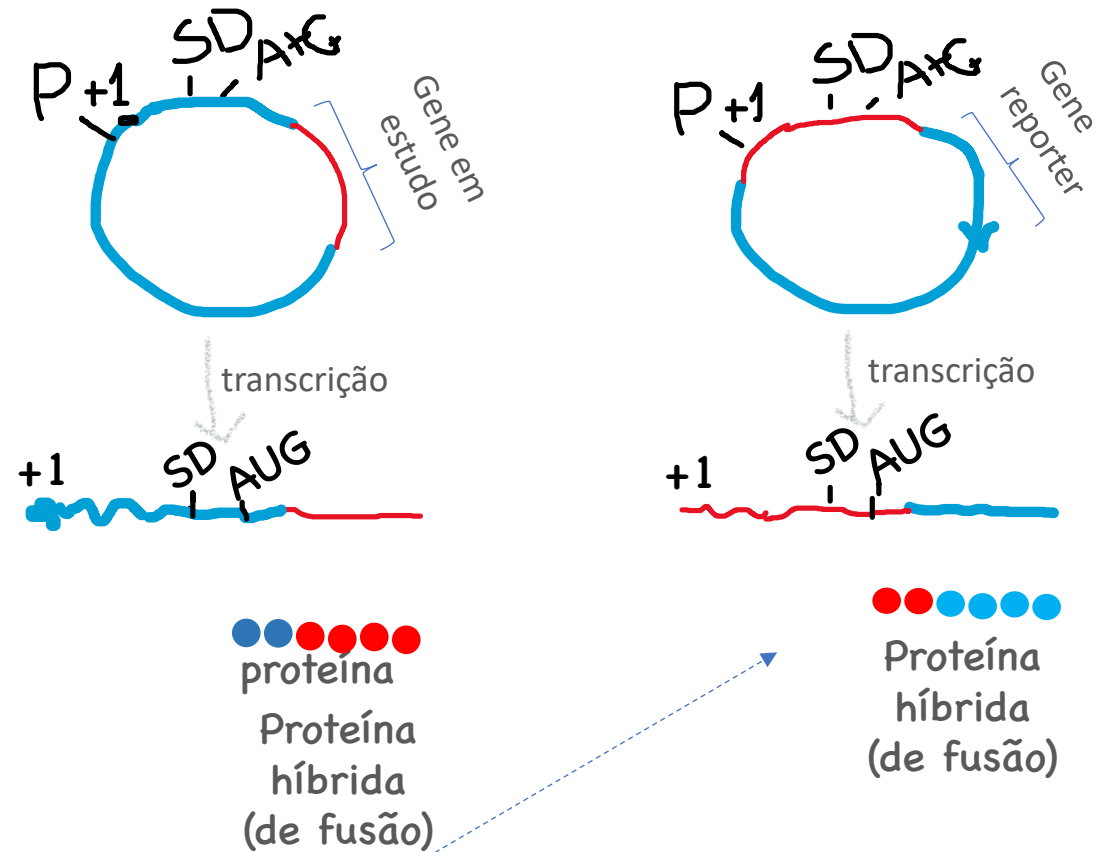
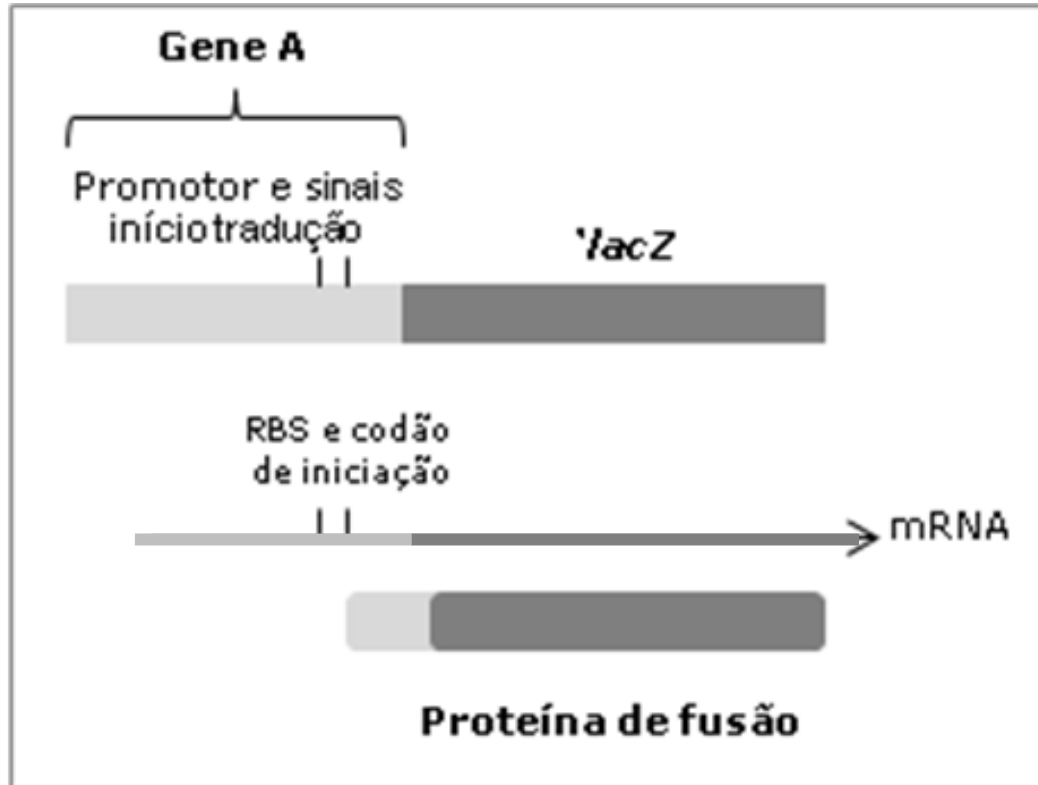


Fusão **transcricional** do gene A com o gene *lacZ*



— Fragmento clonado

Fusões génicas **traducionais**



Fusão **traducional** do gene A com o gene *lacZ* (*lacZ*)

Construção idêntica à dos vectores pNM

— Fragmento clonado

Estrutura geral dos vetores de expressão da série pNM



Representação da região 5' do gene *lacZ* nativo

5' CACACAGGAAACAGCT **ATG** ACCATGATTACGGATTCACTG **GCC** GTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAA... 3'

CCC 9º codão nos vetores pNM

- O gene repóter *lacZ* está incompleto (*'lacZ*); início apenas no 9º codão (modificado), não possuindo os sinais de iniciação da transcrição e da tradução
- $\Delta lacI PO$ *'lacZ lacY* $\Delta lacA$ Amp^R
- Vetores procarióticos, de expressão e de fusão traducional

Polylinker dos vectores pNM

pNM480

EcoRI *SmaI* *BamHI* *SalI* *PstI* *HindIII* gene *lacZ* →
GA ATT CCC GGG GAT CCG **TCG ACC** TGC AGC CAA GCT TGC GAT **CCC** *

pNM481

EcoRI *SmaI* *BamHI* *SalI* *PstI* *HindIII*
GAA TTC CCG GGG ATC C**GT CGA CCT** GCA GCC AAG CTT GCT **CCC** *

pNM482

EcoRI *SmaI* *BamHI* *SalI* *PstI* *HindIII*
G AAT TCC CGG GGA TCC **GTC GAC** CTG CAG CCA AGC TTC GAT **CCC** *

9º codão do gene *lacZ* – **CCC**

Polylinker dos vectores pNM

pNM480

EcoRI *SmaI* *BamHI* *SalI* *PstI* *HindIII* gene *lacZ* →
GA ATT CCC GGG GAT CCG **TCG ACC** TGC AGC CAA GCT TGC GAT CCC

pNM481

EcoRI *SmaI* *BamHI* *SalI* *PstI* *HindIII*
GAA TTC CCG GGG ATC **GT CGA CCT** GCA GCC AAG CTT GCT CCC

pNM482

EcoRI *SmaI* *BamHI* *SalI* *PstI* *HindIII*
G AAT TCC CGG GGA TCC **GTC GAC** CTG CAG CCA AGC TTC GAT CCC

O *polylinker* dos vectores difere entre o local de corte *HindIII* e o 9° codão do gene *lacZ*, em dois nucleótidos no caso de pNM481 (sem GA) ou em um nucleótido no caso de pNM482 (sem G), relativamente a pNM480

GERA-SE NO POLYLINKER UM DESFAZAMENTO RELATIVAMENTE À GRELHA DE LEITURA DE *lacZ*

Estirpe bacteriana

Escherichia coli **MC1061** (Casadaban e Cohen, 1980): F⁻ *araD139* Δ (*araABC-leu*)7697 **Δ *lacX74*** *galU galK* *hsdR* (*r_k*⁻, *m_k*⁺) *rpsL*(Str^R) *thi-1 mcrB*

Mutação **Δ *lacX74***: deleção *lacIPOZY*, isto é, deleção total do operão da lactose, à excepção do gene *lacA*

Meios de cultura/seleção

Frequentemente meio completo (por exemplo, Luria-agar) suplementado com:

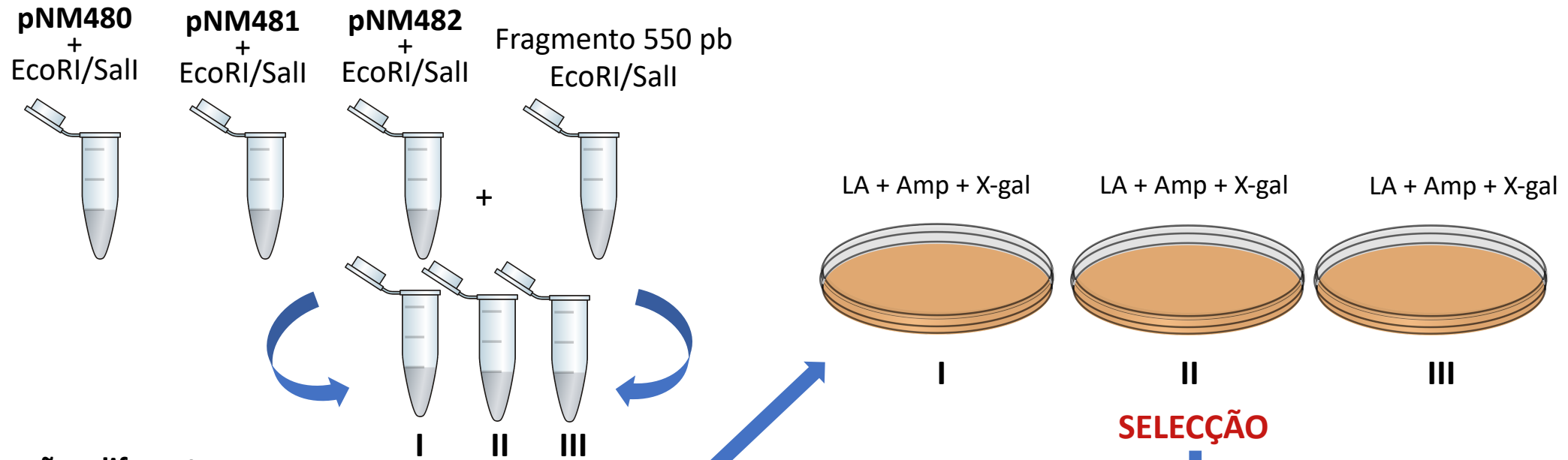
- Amp – **seleção de transformantes**
- X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) – **detecção de fenótipo Lac⁺ (níveis de β -galactosidase)**

Colónias Lac⁺ (azuis)

Colónias Lac⁻ (brancas)

As colónias Lac⁺ expressam β -galactosidase e as colónias Lac⁻ não produzem esta enzima

Trabalho experimental – Clonagem num vector de fusão traducional para detecção dos sinais de transcrição e de tradução de um gene em *Escherichia coli*



3 construções diferentes:

- I - pNM480 + fragmento *EcoRI/Sall* de gene A
- II - pNM481 + fragmento *EcoRI/Sall* de gene A
- III - pNM482 + fragmento *EcoRI/Sall* de gene A

LIGAÇÃO

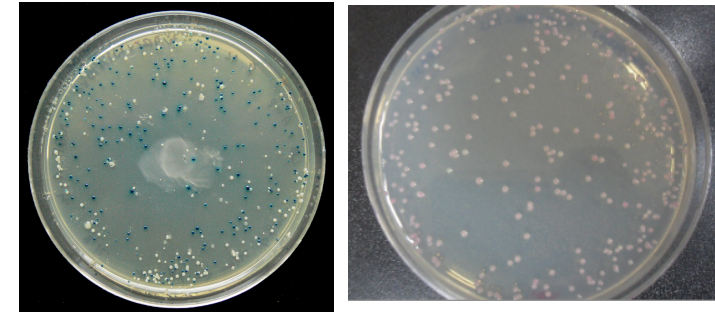


Células competentes
E. coli MC1061
 Δ lacX74

TRANSFORMAÇÃO

SELEÇÃO

Possíveis resultados



Q – Qual é a construção que vai dar origem a colónias azuis?

Colónias azuis (expressão de *lacZ*/produção de β -galactosidade): ATG do fragmento clonado está em fase com o 9º codão de *lacZ* na plasmídeo/construção que deu origem à expressão do gene *lacZ*

Como é que este sistema funciona então?



Região 5' do gene A

GAATTC ... CCATGCCTACATGGTCAAATGCGCTTTCAGTCGACGC

1

2

3

Qual dos 3 ATGs é o verdadeiro codão de iniciação da tradução?

Fragmento *EcoRI/SalI* contendo a região 5' do gene A

1, 2, 3 – três codões ATG putativos

Como é que este sistema funciona então?



Região 5' do gene A
(contendo os sinais responsáveis pelo início da transcrição e da tradução)

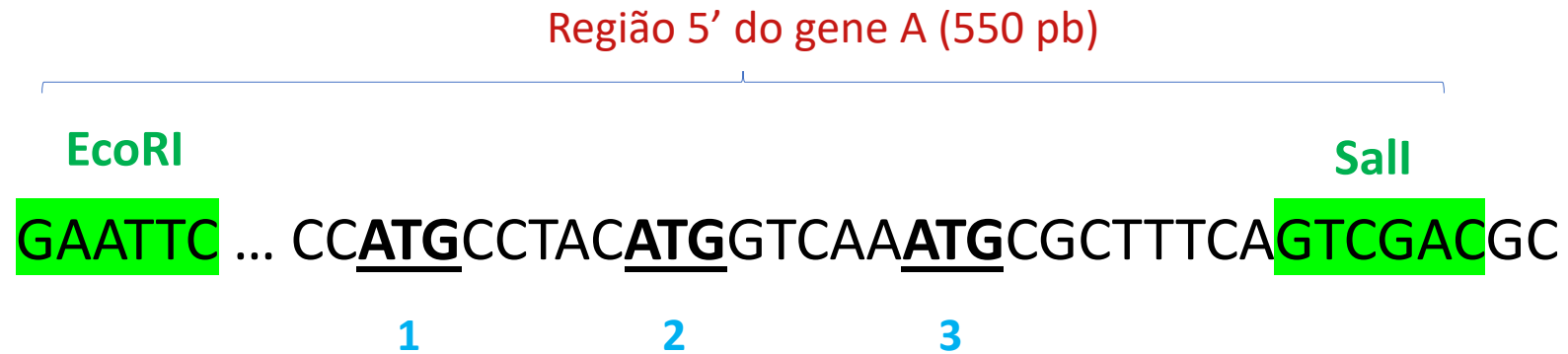
GAATTC ... CCATGCCTACATGGTCAAATGCGCTTTCAGTCGACGC

1 2 3

Qual dos 3 ATGs é o verdadeiro codão de iniciação da tradução?

Aquele que, após clonagem desta região 5' em vectores da série pNM, ficar em fase com o 9º codão de *lacZ* (ie, clonado na mesma grelha de leitura de *lacZ*) permitindo que após seleção dos transformantes, se observe expressão de *lacZ* através da produção de β -galactosidase

Como é que este sistema funciona então?



Clonar o fragmento EcoRI / Sall , contendo esta região 5' do gene A, nos vectores pNM

Que estirpe hospedeira utilizar

Qual o meio selectivo

pNM480
*EcoRI SmaI BamHI SaI PstI HindIII **
GA ATT CCC GGG GAT CC **G TCG AC** C TGC AGC CAA GCT TGC GAT CCC

pNM481
*EcoRI SmaI BamHI SaI PstI HindIII **
GAA TTC CCG GGG ATC C **GT CGA C** CT GCA GCC AAG CTT GCT CCC

pNM482
*EcoRI SmaI BamHI SaI PstI HindIII **
G AAT TCC CGG GGA TCC **GTC GAC** CTG CAG CCA AGC TTC GAT CCC

MCS vectores

EcoRI **SaI**
GAATTC ... CC **ATGCCTACATGGTCAAATGCGCTTTCA** **GTCGAC** GC

Fragmento

pNM480
... GAATTC ... CCA TGC CTA CAT GGT CAA **ATG** CGC TTT CA **G TCG AC** C TGC AGC CAA GCT TGC GAT CCC ...
1 2 3

pNM481
... GAATTC ... C CAT GCC TAC **ATG** GTC AAA TGC GCT TTC A **GT CGA C** CT GCA GCC AAG CTT GCT CCC ...
1 2 3

pNM482
... GAATTC ... CC **ATG** CCT ACA TGG TCA AAT GCG CTT TCA **GTC GAC** CTG CAG CCA AGC TTC GAT CCC ...
1 2 3

Produtos
clonagem

pNM480

... GAATTC ... CCA TGC CTA CAT GGT CAA **ATG** CGC TTT CA**G TCG AC**C TGC AGC CAA GCT TGC GAT CCC ...

pNM481

... GAATTC ... C CAT GCC TAC **ATG** GTC AAA TGC GCT TTC A**GT CGA** CCT GCA GCC AAG CTT GCT CCC ...

pNM482

... GAATTC ... CC**ATG** CCT ACA TGG TCA AAT GCG CTT TCA **GTC GAC** CTG CAG CCA AGC TTC GAT CCC ...

Mainly blue colonies?

YES

3rd ATG – initiation codon

No blue colonies? Mainly white colonies?

YES

3rd ATG – NOT the initiation codon

pNM480
... GAATTC ... CCA TGC CTA CAT GGT CAA **ATG** CGC TTT CA **GTCGAC** TGC AGC CAA GCT TGC GAT CCC ...

pNM481
... GAATTC ... C CAT GCC TAC **ATG** GTC AAA TGC GCT TTC A **GT CGA** CCT GCA GCC AAG CTT GCT CCC ...

pNM482
... GAATTC ... CC **ATG** CCT ACA TGG TCA AAT GCG CTT TCA **GTC GAC** CTG CAG CCA AGC TTC GAT CCC ...

Mainly blue colonies?
YES
2rd ATG – initiation codon

No blue colonies? Mainly white colonies?
YES
2rd ATG – NOT the initiation codon

pNM480
... GAATTC ... CCA TGC CTA CAT GGT CAA **ATG** CGC TTT CA **GTCGAC** TGC AGC CAA GCT TGC GAT CCC ...

pNM481
... GAATTC ... C CAT GCC TAC **ATG** GTC AAA TGC GCT TTC A **GT CGA** CCT GCA GCC AAG CTT GCT CCC ...

pNM482
... GAATTC ... CC **ATG** CCT ACA TGG TCA AAT GCG CTT TCA **GTC GAC** CTG CAG CCA AGC TTC GAT CCC ...

1) Fase de tradução do local de restrição *Sall* nos vectores

pNM480, pNM481 e pNM482, em relação ao 9º codão do gene '*lacZ*

2) Fase de tradução do gene A no local de restrição *Sall*.

Mainly blue colonies?

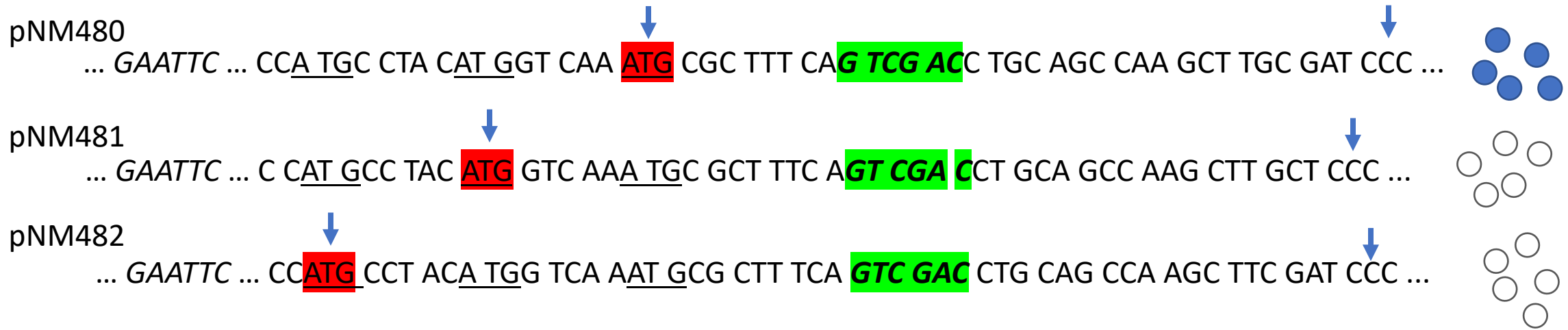
YES

1st ATG – initiation codon

No blue colonies? Mainly white colonies?

YES

1st ATG – NOT the initiation codon

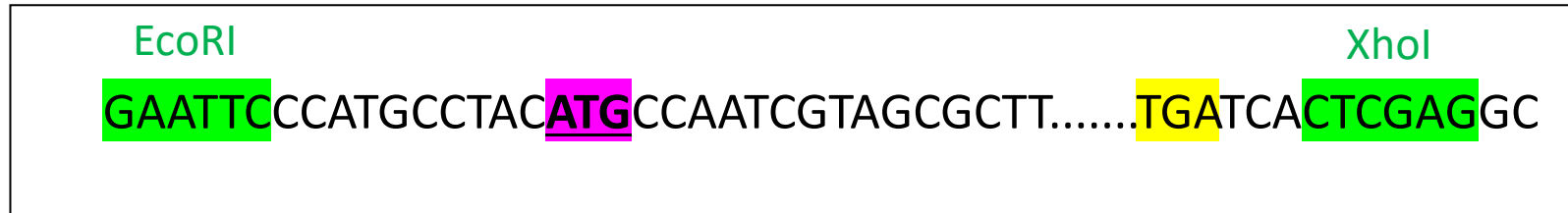


GAATTC ... CCATGCCTACATGGTCAAATGCGC TTT CAG **GTCGAC** C

A fase/grelha de tradução no local de restrição *Sall* nos vetores pNM480/1/2,
 em relação ao 9º codão do gene '*lacZ*,
coincide com a grelha de tradução do gene A
 no local de restrição *Sall*

A importância de clonar em fase – Construção de uma proteína de híbrida ou de fusão

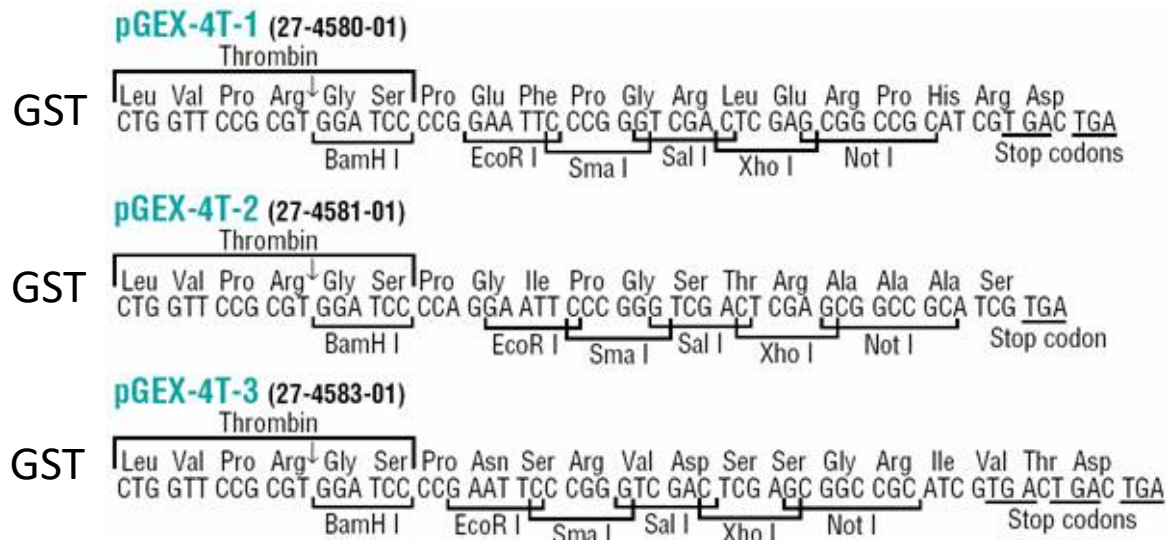
Necessário conhecer as grelhas de leitura dos genes com os quais pretendemos fazer a fusão



Fragmento gene B

ATG – codão de iniciação do gene em estudo

Qual o vector que devo escolher para que, após clonagem fique em fase com o gene repórter?



GST – glutathiona S-transferase

EcoRI XhoI
 GAATTC CAT GCC TAC **ATG** CCA ATC GTA GCG CTT..... **TGATCA** **CTCGAG** GC

G AAT TCC CAT GCC TAC **ATG** CCA ATC GTA GCG CTT..... **TGATCA** **CTCGAG** GC



Fusão GST-gene B

pGEX-4T-1 (27-4580-01)

Thrombin

GST Leu Val Pro Arg ↓ Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp
 CTG GTT CCG CGT **GGA TCC** CCG **GAA TTC** CCG **GGT CGA** **CTC GAG** **CGG CCG** CAT CGT **GAC TGA**
 BamHI EcoRI SmaI SalI XhoI NotI Stop codons

pGEX-4T-2 (27-4581-01)

Thrombin

GST Leu Val Pro Arg ↓ Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser
 CTG GTT CCG CGT **GGA TCC** CCA **GGA ATT** CCC **GGG TCG** ACT CGA **GCG GCC** GCA TCG **TGA**
 BamHI EcoRI SmaI SalI XhoI NotI Stop codon

pGEX-4T-3 (27-4583-01)

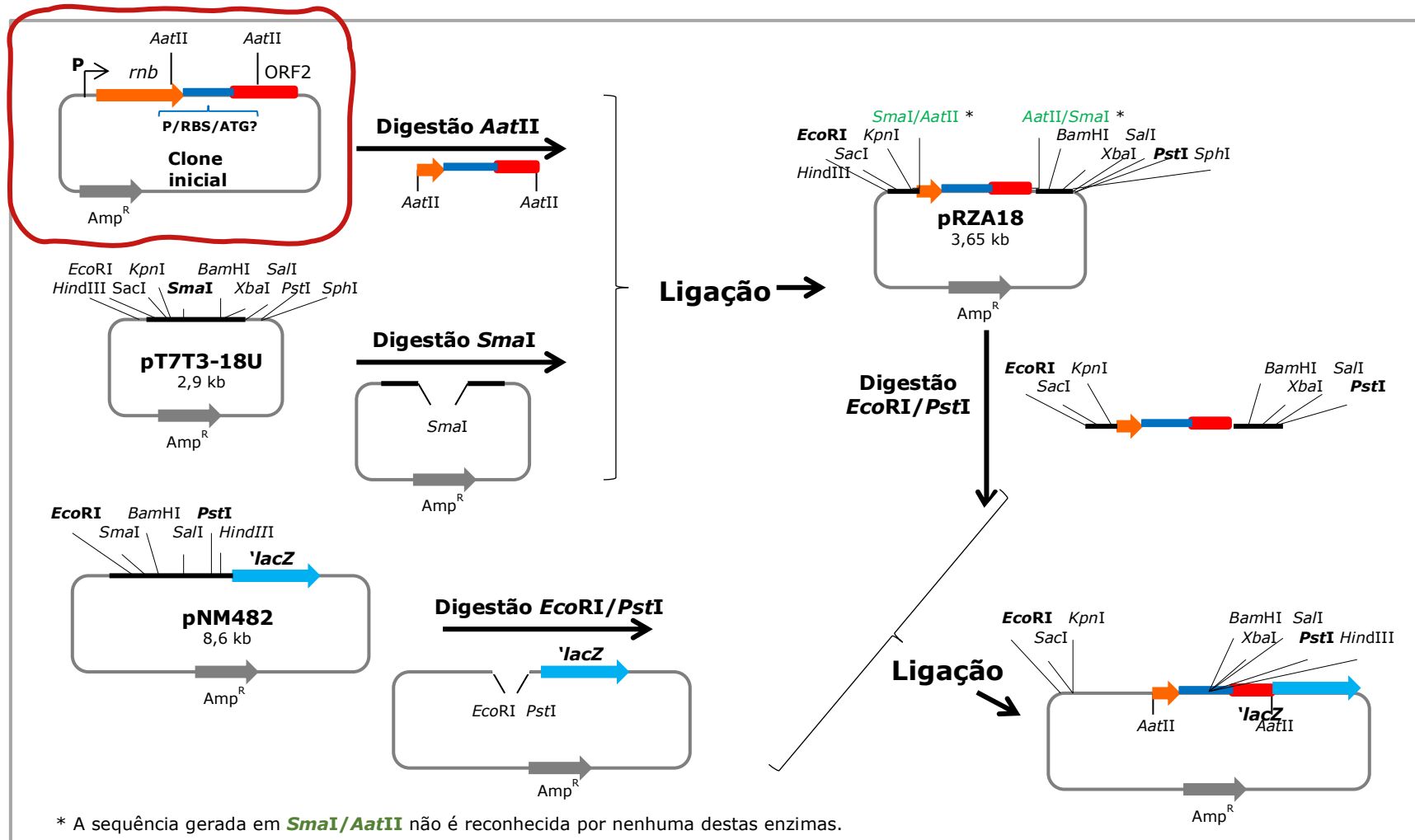
Thrombin

GST Leu Val Pro Arg ↓ Gly Ser Pro Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
 CTG GTT CCG CGT **GGA TCC** CCG **AAT TCC** CGG **GTC GAC** TCG AGC **GGC CGC** ATC **GTG ACT** **GAC TGA**
 BamHI EcoRI SmaI SalI XhoI NotI Stop codons



pGEX-4T-3

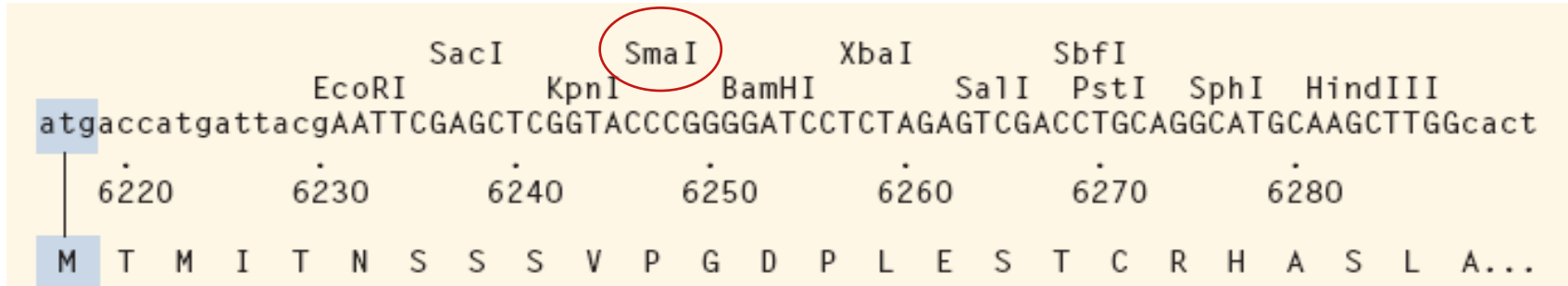
Origem do gene em estudo



Esquema representativo das experiências de clonagem realizadas antes e durante este trabalho laboratorial.

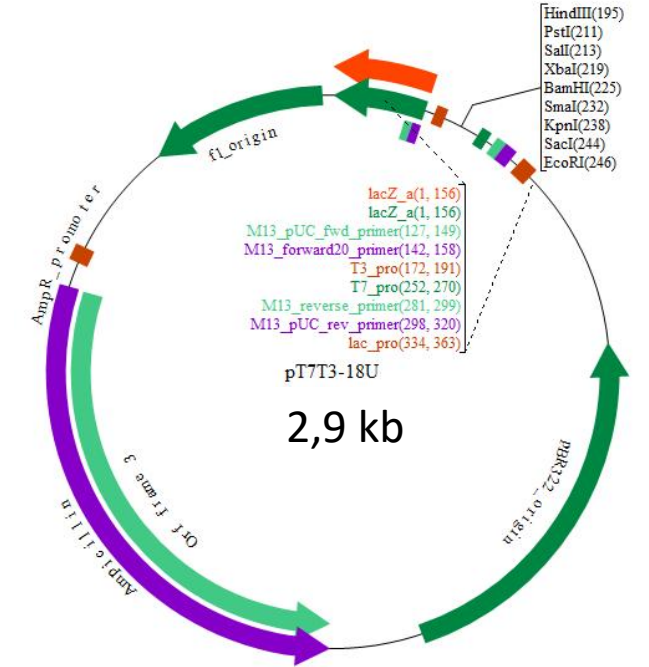
Fragmento AatII de ≈ 740 pb clonado em pT7T3 digerido com SmaI

Polylinker do vector pT7T3 – 18U



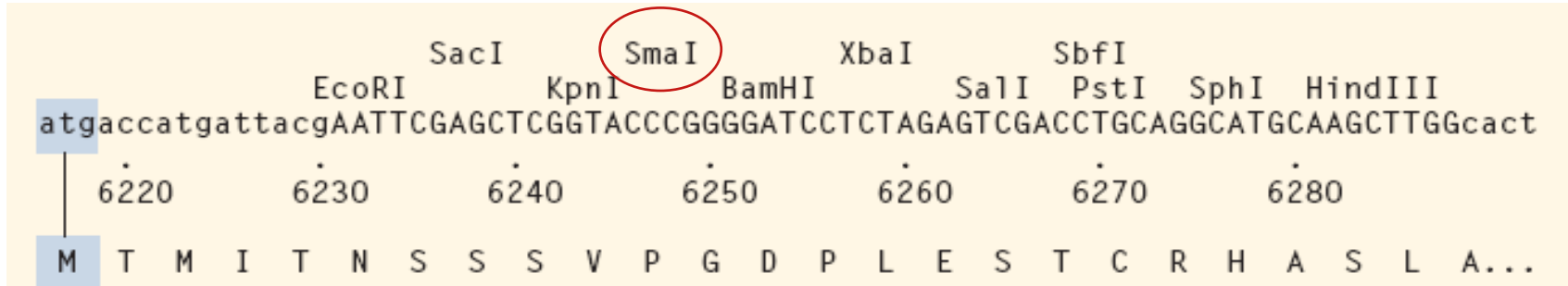
Como foi possível e realizada esta clonagem?

Vector pT7T3 – 18U

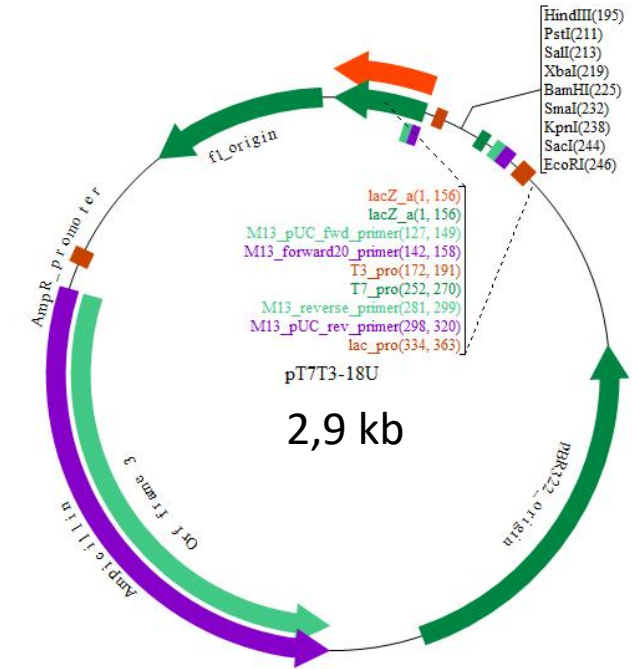


Fragmento AatII de ≈ 740 pb clonado em pT7T3 digerido com SmaI

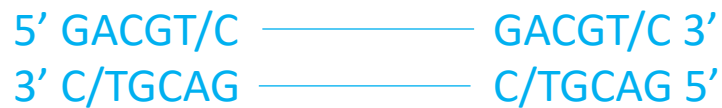
Polylinker do vector pT7T3 – 18U



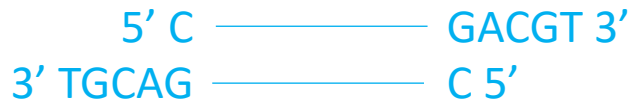
Vector pT7T3 – 18U



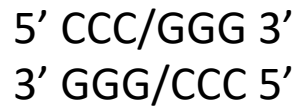
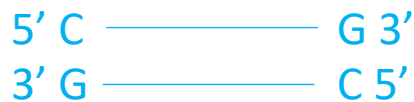
Como foi possível e realizada esta clonagem?



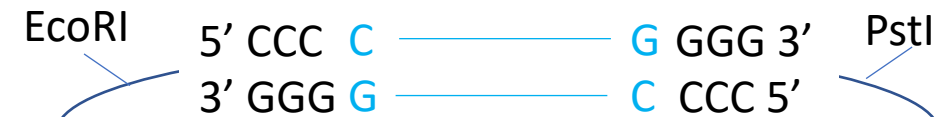
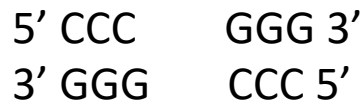
↓ AatII

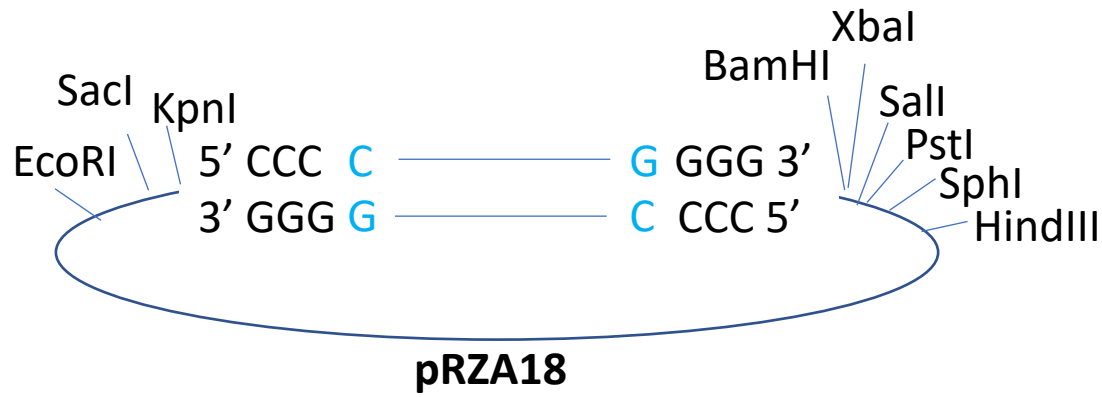


↓ T4 DNA polimerase

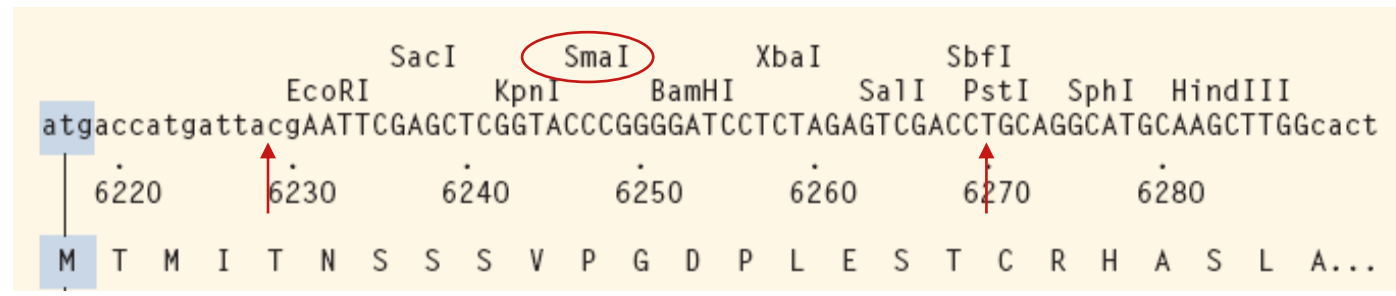


↓ SmaI





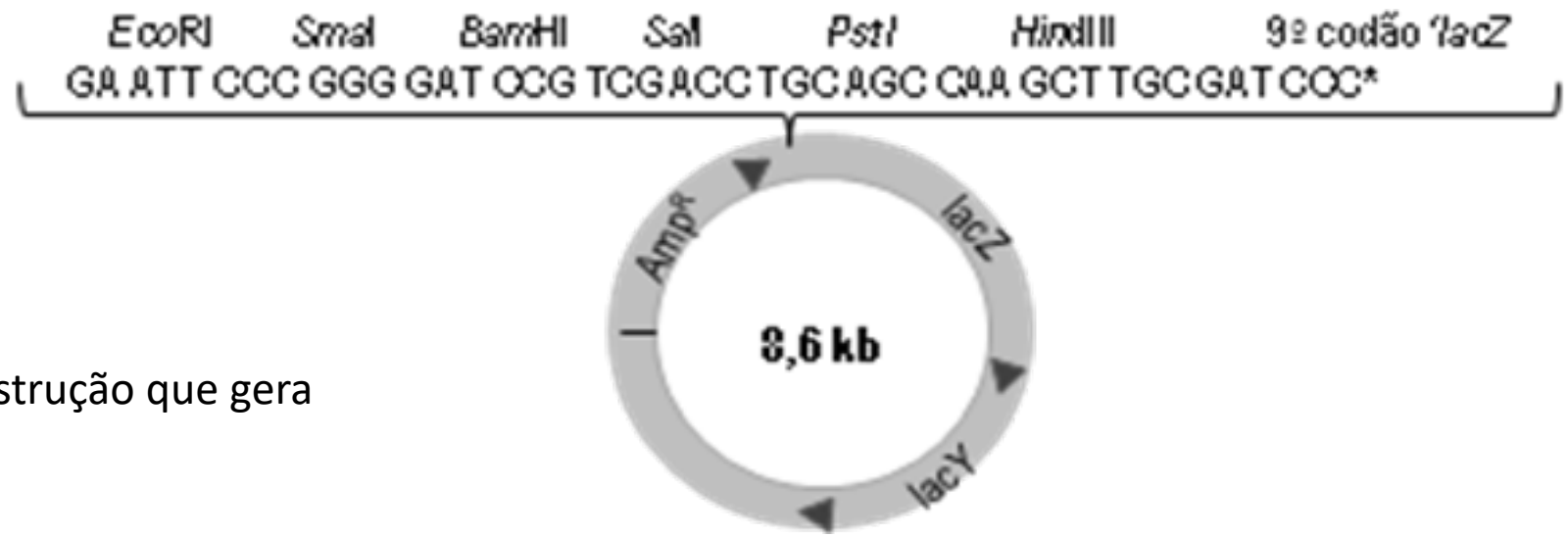
Polylinker do vector pT7T3 – 18U



Clonamos o fragmento EcoRI/PstI de 740 pb em pNM digerido com EcoRI/PstI.

Haveria mais alguma alternativa de clonagem em pNM?

- EcoRI/BamHI
- EcoRI/SalI
- EcoRI/HindIII



Daria o mesmo resultado em termos da construção que gera colónias azuis?

Resumo

Objectivo do trabalho experimental

Neste trabalho prático, baseado num sistema genético que envolve a construção de fusões traducionais nos plasmídios da série pNM, pretende-se esclarecer se a ORF2 corresponde a um gene, através da detecção de sinais de transcrição e de tradução, na região 5' da ORF.

Metodologia geral da experiência de clonagem

Os procedimentos experimentais envolvidos neste trabalho são os seguintes:

- A. Digestão dos vectores pNM480, pNM481 e pNM482 com as enzimas *EcoRI* e *PstI*.
- B. Digestão do plasmídeo recombinante pRZA18 com as enzimas *EcoRI* e *PstI*, e purificação do fragmento *EcoRI/PstI* de 740 pb.
- C. Clonagem do fragmento *EcoRI/PstI* de 740 pb nos vectores pNM480, pNM481 e pNM482.
- D. Transformação da estirpe *E. coli* MC1061 com as construções realizadas.
- E. Selecção e purificação de transformantes Lac⁺, em meio de cultura apropriado.
- F. Extracção do DNA plasmídico de alguns transformantes obtidos nas diferentes clonagens e confirmação das construções moleculares através da digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI*.
- G. Determinação da actividade da β -galactosidase em clones seleccionados.
- H. Confirmação da sequência nucleotídica na zona de junção do fragmento de DNA com o gene *lacZ*.
- I. Análise global dos resultados da experiência de clonagem.

Características da estirpe e dos vectores

Designação	Características relevantes	Fonte/Origem
E. coli MC1061	F ⁻ araD139 Δ(araABC-leu)7697 ΔlacX74 galU galK hsdR(r _k ⁻ ,m _k ⁺) rpsL(Str ^R) thi-1 mcrB	Casadaban e Cohen, 1980
pT7T3-18U	Amp ^R , pBR322 ori	Amersham
pRZA17/pRZA18	Duas orientações diferentes do fragmento AatII-AatII de 0,74 kb no local SmaI de pT7T3-18U	Cairrão et al, 2001
pNM480	ΔlacIPO 'lacZ lacY ΔlacA Amp ^R	Minton, 1984
pNM481	ΔlacIPO 'lacZ lacY ΔlacA Amp ^R	Minton, 1984
pNM482	ΔlacIPO 'lacZ lacY ΔlacA Amp ^R	Minton, 1984